

螺内酯片有关物质检测方法的优化

陈林, 赵培敬(南阳市食品药品检验所, 河南 南阳 473061)

摘要: 目的 优化螺内酯片有关物质的测定方法和供试品溶液制备方法。方法 采用 Welch Materials Eclipse XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(54 : 46)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm 和 283 nm, 柱温 35 °C。样品以流动相为提取溶剂, 超声提取。结果 主峰与各杂质峰均能良好分离。螺内酯、坎利酮分别在 1.00~100.38, 1.03~102.53 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好(*r* 均为 1.000), 回收率分别为 99.52%和 99.23%。结论 本方法结果准确、重复性好、专属性强, 比中国药典方法操作更简便, 可为螺内酯片有关物质检测方法的优化提供参考依据。

关键词: 螺内酯片; 有关物质检测; 优化

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)01-0112-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.015

引用本文: 陈林, 赵培敬. 螺内酯片有关物质检测方法的优化[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 112-115.

Improvement of Determination Method for Related Substance in Spironolactone Tablets

CHEN Lin, ZHAO Peijing(Nanyang Institute for Food and Drug Control, Nanyang 473061, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the method for related substance determination and sample preparation of spironolactone tablets. **METHODS** The detection method was performed on the column of Welch Materials Eclipse XB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-water(54 : 46) at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelengths was 254 nm and 283 nm, column temperature was 35 °C. The samples were extracted by flow phase ultrasonic method. **RESULTS** Related substances were completely separated from the principal component. The linear range of spironolactone and canrenone were 1.00–100.38 μg·mL⁻¹ and 1.03–102.53 μg·mL⁻¹(*r*=1.000), respectively. The average recovery rates were 99.52% and 99.23%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, reproducible and more convenient than the Chinese Pharmacopoeia method, which can provide reference for the optimization of the determination method of spironolactone tablets in the future.

KEYWORDS: spironolactone tablets; related substance determination; improvement

螺内酯片收载于中国药典 2020 年版二部^[1], 是一种醛固酮竞争性抑制剂, 可竞争性抑制醛固酮在远曲小管对钠离子的吸收, 减少机体血容量, 一定程度上缓解门静脉高血压, 常用于中老年高血压、高血压心脏病、门静脉高血压的辅助治疗^[2-3]。螺内酯原料药合成过程复杂, 在脱酯反应、内酯反应及脱氢反应中易产生副产物杂质。良好操作规范中特别强调对千分之一以上含量的杂质应进行控制^[4], 坎利酮是螺内酯中含量相对较高的已知杂质^[5-6], 也是中国药典螺内酯有关物质检查的重点检测对象。

2010 年版以前中国药典采用薄层色谱法对螺内酯片有关物质进行检测, 后来为了提高有关物质检测的准确性, 中国药典 2010 年版^[7]参考英国药典 2008 年版^[8]的方法, 采用 C₈ 柱, 以乙腈-四氢呋喃-水(8 : 18 : 74)为流动相, 采用双波长, 在 283 nm 下检测已知杂质坎利酮, 在 254 nm 下检测

其他杂质的量。然而此色谱系统与含量测定[色谱柱 C₁₈ 柱, 流动相乙腈-水(50 : 50)]完全不相同, 实验中需要更换色谱柱和流动相, 操作不便。此外, 供试品溶液制备方法也相当繁琐, 经历“提取-分离-蒸干-复溶”4 个步骤, 并且使用毒性较大的三氯甲烷提取, 污染环境, 危害实验人员健康。

为解决有关物质与含量测定液相色谱系统不统一及有关物质供试品溶液制备方法繁琐问题, 本实验对此进行了改进, 选择与含量测定相同的色谱系统, 并结合药典含量测定项下供试品溶液制备方法(以流动相为提取溶剂, 振摇提取), 选用流动相为提取溶剂, 超声提取。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); KQ-700DV 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XS205DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司); HWS24 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限

作者简介: 陈林, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: 1185315333@qq.com

公司); RE 旋转蒸发仪(郑州杜甫仪器厂)。

螺内酯对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100193-201704; 含量: 99.9%); 坎利酮对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 101202-202002; 含量: 99.4%); 乙腈、四氢呋喃为色谱纯; 三氯甲烷为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 中国药典方法 色谱柱: Welch Materials Eclipse XB-C₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-四氢呋喃-水(8:18:74); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35℃; 进样量 20 μL; 检测波长 254 nm 和 283 nm。

2.1.2 本方法 色谱柱: Welch Materials Eclipse XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(54:46); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35℃; 进样量 20 μL; 检测波长 254 nm 和 283 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 螺内酯、坎利酮对照品溶液 精密称定螺内酯对照品 25.12 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为螺内酯对照品溶液, 备用。精密称定坎利酮对照品 20.63 mg, 置 20 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为坎利酮对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液 取供试品细粉适量(约相当于螺内酯 62.5 mg), 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相适量, 振摇, 超声处理 15 min, 放至室温, 用流动相定容, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 对照溶液 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.2.4 系统适用性试验溶液 分别精密量取供试品溶液 1 mL、坎利酮对照品溶液 1 mL 置同一 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为系统适用性溶液。

2.3 系统适用性试验比较

取系统适用性溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 采用中国药典方法与本方法分别进行分析, 254 nm 色谱图中坎利酮峰与螺内酯峰分离度应>1.4, 结果见图 1。2 种方法中坎利酮峰和螺内酯峰出峰顺序刚好相反, 在分离度上, 药典方法为 1.42, 本方法为 1.82, 说明本方法分离效果更优。

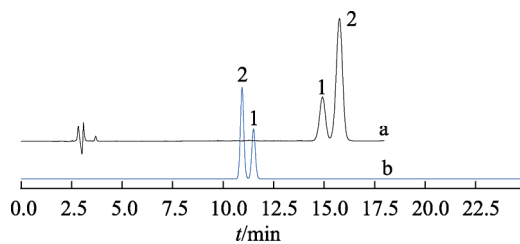


图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

a-中国药典方法; b-本方法; 1-坎利酮; 2-螺内酯。

Fig. 1 HPLC chromatograms of system suitability test
a-method of Chinese Pharmacopoeia; b-this method; 1-canrenone; 2-spirolactone.

2.4 专属性试验

分别精密称定供试品细粉适量(约相当于 62.5 mg 螺内酯), 置 25 mL 量瓶中, 进行酸性、碱性、高温、光照和氧化破坏试验, 按“2.1.2”项下色谱条件分析, 色谱图见图 2。主峰与杂质峰分离度均良好, 表明本方法专属性强。高温破坏和光照破坏未见杂质增加, 酸性破坏杂质略有增加, 强碱破坏和氧化破坏样品分解严重, 说明制剂在生产过程中应注意避免接触强酸、强氧化或强碱性的材料。

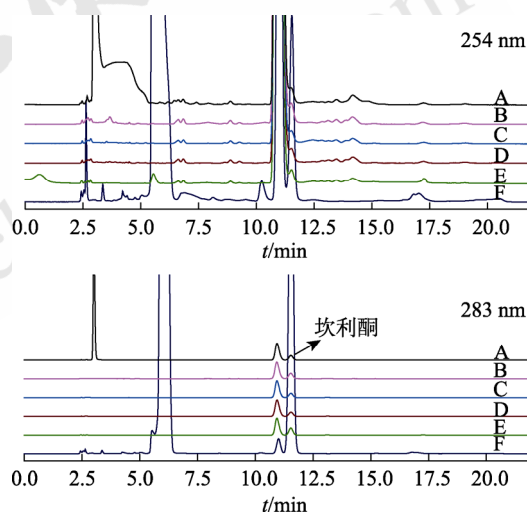


图 2 破坏性试验高效液相色谱图

A-氧化破坏; B-高温破坏; C-光照破坏; D-未破坏; E-酸破坏; F-碱破坏。

Fig. 2 HPLC chromatograms of destructive test
A-destroyed by oxidation; B-destroyed by high temperature; C-destroyed by illumination; D-non-destruction; E-destroyed by acid; F-destroyed by base.

2.5 线性关系考察

分别取螺内酯对照品溶液和坎利酮对照品溶液适量, 依次配制成浓度为 100, 80, 50, 20, 10, 1 μg·mL⁻¹ 系列混合对照品溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件分析, 记录色谱图, 以浓度为横坐标(X),

峰面积为纵坐标(Y), 螺内酯在 $1.00\sim 100.38\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, 线性方程为 $Y=35\ 806X+1\ 007.6$ ($r=1.000$), 坎利酮在 $1.03\sim 102.53\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, 线性方程为 $Y=88\ 263X-11\ 004$ ($r=1.000$)。

2.6 仪器精密性试验

取混合对照品溶液按“2.1.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算得螺内酯峰面积 $\text{RSD}=0.021\%$, 保留时间 $\text{RSD}=0.072\%$, 坎利酮峰面积 $\text{RSD}=0.017\%$, 保留时间 $\text{RSD}=0.085\%$, 表明仪器精密性良好。

2.7 重复性试验

制备供试品溶液 6 份, 按“2.1.2”项下色谱条件分析, 记录色谱图, 计算得坎利酮含量为 0.064% ($\text{RSD}=0.15\%$, $n=6$), 其他杂质总含量为 0.18% ($\text{RSD}=0.21\%$, $n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.8 溶液稳定性试验

制备供试品溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 记录坎利酮峰面积和其他杂质峰面积总和, 结果坎利酮峰面积 RSD 为 0.25% , 其他杂质峰面积总和 RSD 为 0.38% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 检出限、定量限试验

配制不同浓度对照品溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件分析, 以 $S/N\geq 3$ 计算检出限, $S/N\geq 10$ 计算定量限。在 $254\ \text{nm}$ 下螺内酯检出限为 $10.04\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 定量限为 $33.12\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 $283\ \text{nm}$ 下坎利酮检出限为 $10.24\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 定量限为 $34.8\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.10 回收率试验

根据处方称取已知含量样品适量(约相当于螺内酯 $52.5\ \text{mg}$), 共 6 份, 置 $25\ \text{mL}$ 量瓶中, 分别加入螺内酯和坎利酮对照品各约 $10\ \text{mg}$, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 取供试品溶液稀释 100 倍, 按“2.1.2”项下色谱条件分析, 螺内酯平均回收率为 99.52% ($\text{RSD}=0.43\%$), 坎利酮回收率为 99.23% ($\text{RSD}=0.51\%$), 结果见表 1。

2.11 样品测定比较

分别采用本方法和中国药典 2020 年版方法, 对 3 批螺内酯片中有关物质进行检测, 并扫描 $200\sim 300\ \text{nm}$ 的 3D 图, 液相色谱图见图 3, 3D 图见图 4, 杂质检出量结果见表 2。2 种方法杂质峰与主峰分离度均良好, 其他杂质检出量相当, 但坎利酮检出量本方法比中国药典方法高约 20% 。

表 1 回收率试验结果($n=6$)

Tab. 1 Result of recovery($n=6$)

药品名称	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/%	RSD/%
螺内酯	52.27	10.25	62.38	99.78	99.52	0.43
	52.19	10.33	62.36	99.75		
	52.29	10.28	61.79	98.76		
	52.34	10.26	62.18	99.33		
	51.79	10.78	62.53	99.94		
	52.07	10.19	61.99	99.56		
坎利酮	0.03	10.12	10.12	99.72	99.23	0.51
	0.03	10.23	10.22	99.58		
	0.03	10.05	9.91	98.32		
	0.03	10.33	10.26	98.98		
	0.03	10.26	10.23	99.43		
	0.03	10.58	10.54	99.34		

中国药典方法加入 $2.5\ \text{mL}$ 四氢呋喃复溶残渣, 实验中发现溶液中有白色物质析出, 此时坎利酮检出量比本方法低。当将四氢呋喃体积加大到 $5\ \text{mL}$ 时, 坎利酮检出量与研究方法相当, 分析可能是析出的沉淀物将部分坎利酮吸附, 从而导致其含量降低。本方法只需简单的超声提取, 未经复溶转移过程, 对坎利酮定量更为准确。

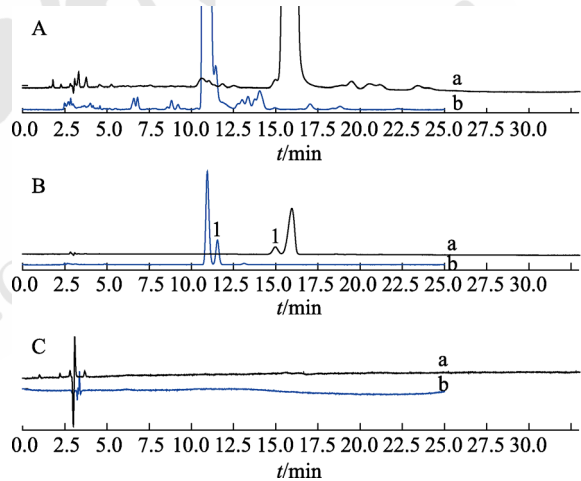


图 3 样品测定高效液相色谱图

A-样品溶液($254\ \text{nm}$); B-样品溶液($283\ \text{nm}$); C-空白($254\ \text{nm}$); a-中国药典方法; b-本方法; 1-坎利酮。

Fig. 3 HPLC chromatograms of sample detection

A-solution of sample($254\ \text{nm}$); B-solution of sample($283\ \text{nm}$); C-blank($254\ \text{nm}$); a-method of Chinese Pharmacopoeia; b-this method; 1-canrenone.

表 2 螺内酯片有关物质测定结果($n=3$)

Tab. 2 Result of related substance in Spironolactone tablets ($n=3$)

批次	坎利酮含量/%		其他杂质总量/%	
	中国药典方法	本方法	中国药典方法	本方法
01	0.048	0.061	0.18	0.18
02	0.050	0.063	0.33	0.33
03	0.039	0.049	0.18	0.18

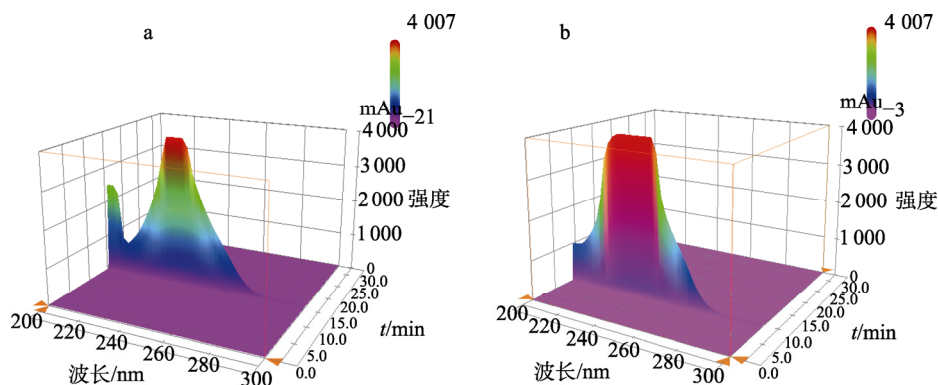


图4 样品测定 3D 扫描图(200~300 nm)

a-中国药典方法; b-本方法。

Fig. 4 3D scanning diagram of sample detection(200–300 nm)
a-method of Chinese Pharmacopoeia; b-this method.

3 讨论

中国药典 2020 年版只对螺内酯中含量较高的已知杂质坎利酮进行准确定量, 其他杂质定量则采用自身对照法以杂质总量计($\leq 1.0\%$), 故系统适用性试验只对坎利酮峰和螺内酯峰的分离度有要求, 对其他未知杂质之间的分离度不作要求, 故本方法可满足中国药典 2020 年版系统适用性要求。虽然本方法的色谱系统对部分其他未知杂质间的分离不够完全, 但其他杂质以总量计, 故本方法所建立的色谱系统不影响对其他杂质的定量。

中国药典 2020 年版在 254 nm 下进行系统适用性试验考察和对未知杂质检测, 在 283 nm 下检测坎利酮。为确定检测波长, 扫描 200~300 nm 的 3D 图, 结果见图 4, 在本方法的色谱系统中螺内酯和其他杂质的最大吸收波长与药典方法相同, 均在 240~260 nm。另外本方法色谱系统中坎利酮的最大吸收波长为 285 nm, 与药典方法 283 nm 相近, 故最终仍选用药典方法的测定波长。

在提取溶剂的选择上, 研究根据螺内酯的溶解性(易溶于三氯甲烷, 在乙醇中溶解), 并结合文献[8-11]报道和中国药典螺内酯含量测定的提取方法, 考察了乙醇、甲醇、流动相[乙腈-水(54:46)]3 个提取系统, 采用超声提取方式, 结果 3 种提取溶剂对杂质提取效果相当, 故最终选择流动相作为提取溶剂。在超声提取时间上考察了 5, 10, 15, 20 min 的提取效果, 结果超声 10 min 后坎利酮含量恒定, 超声 15 min 后其他杂质总量恒定, 故最终选择超声提取 15 min。

与中国药典方法相比, 本方法供试品溶液制备过程和检测方法更简便, 对杂质定量结果准确,

在 1 个色谱系统中即可完成螺内酯片中有关物质的检测和含量的测定, 大大提高了检验效率, 节约了实验成本, 可为今后螺内酯片有关物质检测方法的优化提供参考依据。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2020: 附录 1878-1879.
- [2] LU L H, LIAO T, LI H L, et al. The effect of Spironolactone combined with Amlodipine Mesylate Tablets in the treatment of elderly hypertensive heart disease[J]. China Mod Med(中国当代医药), 2018, 25(13): 16-19.
- [3] SHANG H, ZHANG G S, WANG S Y, et al. Carvediol combined with low-dose spironolactone in the prevention of rebleeding in cirrhotic patients with variceal bleeding[J]. Chin J Clin Res(中国临床研究), 2021, 34(9): 1204-1208.
- [4] ZHAO L, CHEN H, WANG Y F, et al. Isolation and identification of impurities in spironolactone[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(3): 230-231, 238.
- [5] QU Y, TANG S F. Determination of related substances in spironolactone by HPLC[J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2011, 12(1): 22-24.
- [6] BAI Y. Analysis and control of the impurity in spironolactone[D]. Tianjin: Tianjin University, 2011.
- [7] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 1172-1173.
- [8] BP(2008)[S]. 2008: 1065.
- [9] FAN Y F, WANG Q. Simultaneous determination of 4 components in compound metronidazole clindamycin cream by HPLC[J]. China Pharm(中国药房), 2017, 28(24): 3418-3421.
- [10] PENG X D, TANG Z L, LONG F, et al. Content determination of tinidazole and spironolactone cream by HPLC[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2013, 28(2): 145-147.
- [11] SHANGGUAN K K, LI M Z, YANG J R, et al. Study of the quality control of the compound furosemide and spironolactone capsules[J]. J Tianjin Med Univ(天津医科大学学报), 2016, 22(1): 80-83.

收稿日期: 2021-12-06

(本文责编: 陈怡心)